

应用 LED 电筒对小鼠体内荧光肿瘤的简易整体成像技术

Meng Yang¹, George Luiken², Eugene Baranov¹, and Robert Hoffman¹

¹AntiCancer, Inc. San Diego, and ²Fluoro-Probe, Inc., Coronado, CA, USA

我们实验室已经率先建立了用绿色荧光蛋白(GFP)在体内发现细胞并使之可视化的方法。这一荧光工具首次使得显微镜下才能观察到的肿瘤细胞能够在活体宿主的器官上被发现并可视化¹。

使用 GFP 的整体成像技术也是我们实验室建立的²。各种荧光肿瘤在小鼠体内的生长和转移可以实时地被成像。基于 GFP 的整体成像是非侵袭性的外部成像技术。这一技术对在完整的动物体内生长的恶性肿瘤提供了前所未有的连续性的可视监视。而且不必注射底物和使用麻醉。对生长在内脏器官上的肿瘤的定量测量由数码化的整体影像来确定。成像由荧光透视显微镜或荧光暗箱和 CCD 相机来完成²。

最近 Tyas 等用蓝色 LED 电筒对 GFP 转基因鼠进行基因表现型的分类。这些小鼠的大多数组织表达高水平的绿色荧光蛋白。Tyas 和他的同事用发蓝光的 LED 电筒去激发活体动物上的绿色荧光蛋白并通过适当的滤光片来观察识别 GFP 阳性的转基因幼鼠³。

我们在此报道使用蓝色 LED 手电筒附加 D470/40 滤光片 (Chroma, USA) 作为激发光, 并用能透过波长高于 515nm 光线的滤光片进行观察, 能够将生长在小鼠体内器官上表达 GFP 或 RFP (红色荧光蛋白) 的肿瘤在活体小鼠整体成像²。

图 1A 显示种植在小鼠脑内的两个肿瘤的整体影像。其中一个表达绿色荧光蛋白, 另一个表达红色荧光蛋白。影像显示表达绿色和红色荧光蛋白的肿瘤的荧光可以同时被安装了 D470/40 滤光片的蓝色 LED 手电筒的光源所激发并被成像。图 1B 显示了使用蓝色 LED 手电筒光源作为激发光将种植在骨头里的表达绿色荧光蛋白的肿瘤整体成像。

图 2A 显示了使用蓝色 LED 手电筒光源作为激发光将种植在结肠上的表达绿色荧光蛋白的肿瘤整体成像。整体成像以后, 实验动物的腹腔被打开, 并且在同样的位置上用同样的方法直接成像 (图 2B)。通过图 2A 和图 2B 的比较说明了图 2A 中整体影像的高度正确性。

图 2C 显示了种植在同一小鼠体内肝脏上的红色荧光蛋白肿瘤和胰脏上绿色荧光蛋白肿瘤的图像。如同图 1 所示的表达红色或绿色荧光蛋白的颅内种植肿瘤，种植在肝脏上的 RFP 肿瘤和胰脏上 GFP 肿瘤均可同时被用蓝色 LED 手电筒的光源所激发。图 2D 显示了种植在胰脏上表达红色荧光蛋白肿瘤的影像。

影像是用 Hamamatsu C5810CCD three-chip cooled color CCD 相机，(Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) 拍摄的。然而，用更为简单的数码相机也能获得可以接受的效果。图 1 和图 2 所显示的影像肉眼可以很容易地看清。不需要麻醉，注射底物或限制动物活动。荧光影像的像素数量和强度可用计算机软件转换为荧光强度并以平方毫米为单位计算肿瘤的面积（表 1）。

荧光强度是所有可检测的 GFP 信号的平均值。它由 CCD 相机绿色信号频道的“智力计算”所定义的相对单位所定。极限值为肉眼能够辨认的高于背景的自发荧光的强度。表 2 将结肠肿瘤的整体影像和直接影像的大小及荧光强度做了对比。从表 2 可以看出直接影像和整体影像的大小是可以相比拟的。更为引人注目的是整体影像的荧光强度约为直接影像的百分之七十。尽管在整体影像成像过程中由于光线的散射导致某些信息的丢失，但用如此简单的设备仍可获得成像所需的足够的信息量。

先前的研究表明整体影像和实际肿瘤的体积的大小是有相关性的⁴。然而，对荧光强度较弱的肿瘤可能要求用更高级的设备才能得到好的整体影像。

从本篇报告中的实研资料和数据可以得出以下结论：

- (i) 表达 GFP 和 RFP 的肿瘤在动物体内可以发出很强的荧光信号。
- (ii) 荧光影像很容易被定量测量。
- (iii) 动物体内的自发荧光的干扰可以被忽略不计。
- (iv) 廉价的简单仪器可以用于对表达 GFP 和 RFP 的肿瘤在动物体内的整体成像。

这些实验数据显示了基于荧光蛋白的整体成像技术在快速体内药物筛选和其它方面的应用有着巨大的潜力。实验数据同时也纠正了一些文章对体内荧光蛋白的整体成像技术的所谓局限性的严重误解^{5,6}。

表 1。肿瘤的整体影像的定量

肿瘤的部位	面积（像素）	面积（mm ² ）
脑（GFP）	912	6.00
脑（RFP）	811	5.34
骨（GFP）	3561	23.42
肠（GFP）	2465	16.22
整体成像		
肠（GFP）	2731	17.97
直接成像		
胰腺（GFP）	2813	18.51
肝（RFP）	2254	14.83
胰腺（RFP）	25103	165.15

表 2。结肠 GFP 肿瘤的整体成像与直接成像的对比

成像方法	面积（像素）	荧光的强度
整体成像	2465	137
直接成像	2731	196

成像是使用蓝色 LED 手电筒光源作为激发光而得到的。荧光的强度是由 CCD 相机绿色信号频道的“智力计算”所定义的相对单位所测定的。

GFP 绿色荧光蛋白，RFP 红色荧光蛋白。

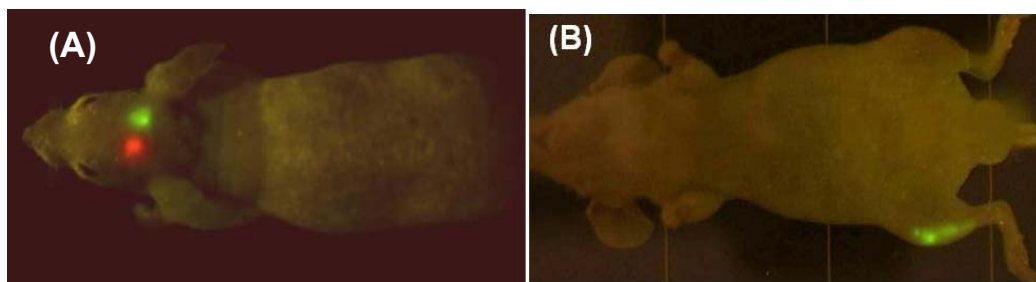


图 1A 显示种植在小鼠脑内的两个肿瘤的整体影像。其中一个表达绿色荧光蛋白(GFP)，另一个表达红色荧光蛋白(RFP)。(A 表达绿色和红色荧光蛋白的肿瘤种植在同一个小鼠脑内。带有 470 nm 滤光片的蓝色 LED 手电筒的光源所激发的荧光被 Hamamatsu C5810CCD three-chip cooled color CCD 相机成像。(B) 显示了使用蓝色 LED 手电筒光源作为激发光将种植在胫骨的表达绿色荧光蛋白的肿瘤整体成像。

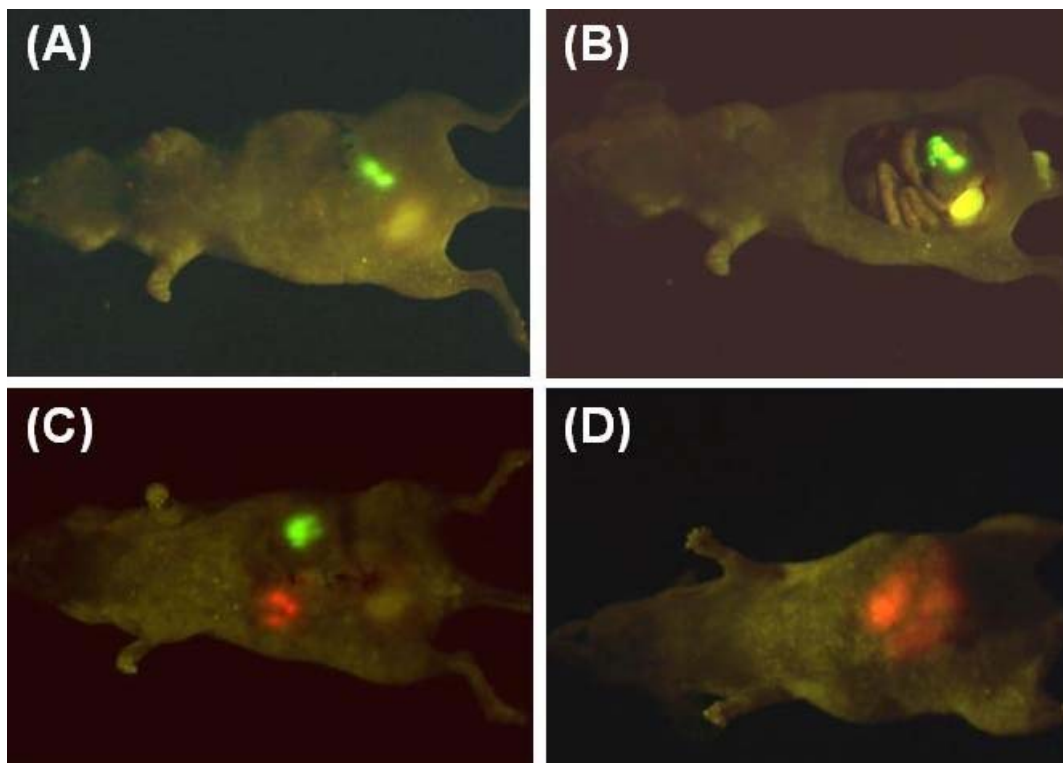


图 2。表达绿色和红色荧光蛋白的肿瘤在裸鼠体内的整体成像和直接成像。(A) 显示了使用蓝色 LED 手电筒光源作为激发光将种植在结肠上的表达绿色荧光蛋白的肿瘤整体成像。(B) 整体成像以后，实验动物的腹腔被打开，并且在同样的位

置上用同样的方法直接成像。(C) 种植在同一小鼠体内肝脏上的红色荧光蛋白肿瘤和胰脏上绿色荧光蛋白肿瘤同时被用蓝色 LED 手电筒的光源所激发的图像。(D) 种植在裸鼠胰脏上表达红色荧光蛋白肿瘤转移的整体影像。(A-D) 使用了与图 1 同样的蓝色 LED 手电筒。

References:

1. Chishima, T., et al., 1997. Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res.*, 57:2042-2047
2. Yang, M., et al., 2000. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1206-1211
3. Tyas, D.A., 2003. Identifying GFP-transgenic animals by flashlight. *BioTechniques* 34:474-476.
4. Kazt, M.H., et al, 2003. A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics. *J. Surg. Res.* 113:151-160.
5. Gross, S., 2005. Spying on cancer: molecular imaging in vivo with genetically encoded reporters. *Cancer Cell* 7:5-15.
6. Weissleder, R. and Ntziachristos. 2003. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* 9:123-128.